Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 235- 247

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۴۷-۲۳۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

## Full Research Paper

# Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM)

Bahman Saedpanah[1], Nasser Behroozi[2*], Jalal Khorshidi[3]

Received: 2020.12.15
Accepted: 2021.03.09

**How to cite this article:**
Saedpanah, B., Behroozi, N., Khorshidi, J. (2022). Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 235-247.

**Abstract**

**Introduction:** Microwave-assisted extraction (MAE) is one of the newest techniques for extracting essential oils from medicinal plants. Microwave waves penetrate into plant cells and affect the polar molecules, causing heat to build up inside the plant tissue, destroying the cells and releasing the active ingredients. Although in terms of essential oil extraction efficiency, MAE method is slightly higher than Clevenger, but in terms of energy consumption, process time and amount of solvent consumed has an inherent advantage over the Clevenger method. In this study, the aim is to evaluate the quantity and quality of rosemary essential oil in the developed microwave extraction system and process optimization in this system.

**Materials and Methods:** Rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.) with 200 g used for each experiment. In this study, a microwave-assisted essential oil extraction system was developed. The system consisted of a home microwave, a distillation condenser, a cold-water source and a pump. In this study, the response surface methodology (RSM) used in the form of a central composite design with 13 treatments. The effect of two independent variables including power in the range of 300 to 900 watts and time in the range of 5 to 35 minutes on the efficiency of essential oil as dependent variables was investigated. To evaluate the quality of the extracted essential oil and compare it with Clevenger treatment, GC-Mass analysis was done using an Agilent technology apparatus (Agilent 7990B, USA).

**Results and Discussion:** A quadratic model was proposed for modelling of extraction efficiency and it was able to model with the values of $R^2$, Adj $R^2$ and Pred $R^2$, which were 0.9521, 0.9180 and 0.574, respectively. The "Pred $R^2$" of 0.547 is not as close to the "Adj $R^2$" of 0.9180 as one might normally expect. The difference is more than 0.2. This may indicate a large block effect or a possible problem with the proposed model and/or data. Things to be considered for model modification are model reduction and response transformation. Results of ANOVA showed that only the linear terms of time, power and quadratic power of time are significant. The normal probability plot showed the normal distribution of errors observed in the experimental design space. The actual measured values $R^2$ of the extracting efficiency from the experiments versus the values $R^2$ predicted by the model indicated that this model could estimate the extracting efficiency with a correlation coefficient of 0.746. Box-Cox plot demonstrated for obtaining better results, the data of the amount of essential oil efficiency should be transferred to the power of 0.68 by the power function and the new model should be fitted to the data. Therefore, based on the Box-Cox diagram and the transfer of response data to the power space, as well as the use of a step-by-step method to remove meaningless terms from the model, the proposed model is as shown in equation 6. The results of the new model shows that the Pred $R^2$ increased from 0.5574 to 0.8644, which indicates an

1 and 2. Former MSc student and Assistant professor, Department of Biosystems Engineering, University of Kurdistan, Iran.
3. Assistant professor, Department of Horticultural Science and Engineering, University of Kurdistan, Iran.
(*Corresponding Author Email: n.behroozi@uok.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67786.1001

improvement in the performance of the new model. Alpha-pinene, camphene, borneol, camphor, cineole, and caryophyllene were the predominant compounds of the essential oil. In 300 and 600-watt treatments with a time of 35 minutes, the amount of dominant compounds of essential oil is slightly higher than Clevenger. However, in the power of 900 watts, due to the increase in temperature, some compounds have been destroyed and the extraction level of some compounds has decreased drastically, and in contrast, the level of caryophyllene was increased to 23.595 %, which indicates a sharp increase in its value at 900 watts. On the other hand, the components of alphapenine, camphor and cineole have the highest medicinal value, which according to Table 8, the highest values for these compounds have been extracted in 300 watt treatment. At the higher microwave power, due to the decomposition of the compounds, the amount of extraction of these compounds was significantly reduced. Also, at 300 watts, the extraction efficiency of these compounds was higher than that of Clevenger, which shows the ability of the MAE method in extracting essential oils from medicinal plants.

The results showed that the amount and quality of essential oil in the MAE with power of 300 and 600 watts was almost the same as Clevenger in most compounds. Essential oil compounds are degraded at 900 watts, so it is recommended not to use maximum power in the experiments. However, if the goal is to extract the highest amount of cariophylene, verbenone and cariophylene oxide in the extracted essential oil, higher power can be used.

**Keywords:** Essential oil, extraction Time, Response surface method, Microwave, Rosemary.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 235- 247

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۴۷-۲۳۵

مقاله علمی- پژوهشی

# مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری به کمک مایکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

بهمن ساعدپناه[۱]- ناصر بهروزی خزاعی[۲*]- جلال خورشیدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹

## چکیده

توسعه روش‌های نوین برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی روزبه‌روز در حال گسترش است. هدف از این پژوهش، پیاده‌سازی و ارزیابی سامانه استخراج اسانس به کمک مایکروویو می‌باشد. ۱۳ آزمایش با سه سطح توان (۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ وات) و سه سطح زمان (۵، ۲۰ و ۳۵ دقیقه) برای اندازه‌گیری بازده اسانس استخراجی در نظر گرفته شد. بازده اسانس استخراجی به کمک روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی (CCD) مدل‌سازی و بهینه‌سازی شد. همچنین نوع و میزان ترکیبات اسانس استخراجی در هر تیمار آزمایشی به کمک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC- MS) و کروماتوگرافی گازی (GC) تعیین گردید. بازده و کیفیت اسانس استخراجی توسط کلونجر هم به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که مدل درجه دو توانی قادر است بازده اسانس را با $R^2$، $R^2_{Adj}$ و $R^2_{Pre}$ به‌ترتیب با مقادیر ۰/۹۵۹۰، ۰/۹۴۵۹ و۰/۸۸۶۴ پیش‌بینی کند. همچنین نتایج بهینه‌سازی نشان داد که توان ۸۶۶ وات و زمان ۳۴ دقیقه به‌عنوان شرایط بهینه کاری سامانه اسانس‌گیری به‌دست آمد که با این شرایط کاری بازده اسانس استخراجی به ۰/۳۷ درصد (حجمی/ وزنی) رسید. همچنین تجزیه و تحلیل اسانس‌ها نشان داد در تیمارهای مختلف تعداد و درصد ترکیبات غالب به‌دست آمده متفاوت هستند. در تیمار ۹۰۰ وات، ترکیبات غالب اسانس کاریوفیلن و بورنئول بودند، در حالیکه در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ وات و کلونجر ترکیبات غالب اسانس، آلفاپینن، کامفن و کامفور بودند.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس‌گیری، زمان استخراج، روش سطح پاسخ، کلونجر، مایکروویو.

## مقدمه

تقاضای بالای صنایع داروسازی، غذایی، آرایشی و بهداشتی به مواد موثره گیاهان دارویی منجر به توجه فراوان به کشت و اهلی کردن، اصلاح گونه‌های مهم، بررسی شیوه‌های نوین در افزایش عملکرد مواد مؤثره و فرآوری این نوع گیاهان شده است. این عوامل منجر به آن شده است بیشتر کشورها برنامه‌های جامعی برای شکوفایی کشت گیاهان دارویی داشته باشند.

برای ایجاد سودآوری در زمینه گیاهان دارویی، علاوه بر کشت و توسعه مزارع به صورت مکانیزه، نیاز به فرآوری و ایجاد ارزش افزوده بالا برای گیاهان دارویی لازم و ضروروی است. اسانس گیاهان دارویی در صنایع زیادی به‌عنوان یک ماده ارزشمند اولیه استفاده می‌شود. روش‌های قدیمی استخراج اسانس مانند کلونجر دارای بازده پایین، زمان طولانی و مصرف بالای حلال برای فرآیند استخراج دارند. همچنین کیفیت اسانس استخراجی به‌خصوص برای مواد حساس به دما کاهش می‌یابد (Omidbaigi, 2009; Bagade and Patil, 2019). لذا توسعه تکنیک‌های جدید و ترکیب فناوری‌ها برای استخراج مواد موثره در گیاهان دارویی، تبدیل یک از نیازهای ضروری در زمینه فرآوری گیاهان دارویی شده است. مزیت اصلی توسعه تکنیک‌ها و فناوری‌های ترکیبی استخراج، افزایش بازدهی تولید و کمک به حفاظت از محیط زیست با کاهش استفاده از حلال و مصرف انرژی فسیلی است (Stashenko et al,. 2004). روش استخراج به کمک مایکروویو (MAE)[۴] یک از این فناوری‌های در حال توسعه می‌باشد. در این روش گیاه با حلال در یک بالن در داخل آون مایکروویو قرار می‌گیرند. امواج مایکروویو به داخل سلول‌های گیاهی نفوذ کرده و با تاثیر بر مولکول‌های قطبی منجر به ایجاد حرارت در داخل بافت گیاهی در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: n.behroozi@uok.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67786.1001
4 Microwave-assisted extraction(MAE)

نتیجه تخریب سلول‌ها و آزاد شدن مواد موثره می‌گردند (Kaufmann et al., 2001). در این سیستم خنک‌کننده و بخش بازیابی اسانس در خارج از آون قرار دارد. بخارات حلال و اسانس وارد سیستم خنک‌کننده سامانه شده و توسط خنک‌کننده بخارات چگالیده می‌شوند (Stashenko et al,. 2004).

هرچند از نظر بازده استخراج اسانس روش MAE برابر با کلونجر می‌باشد ولی از میزان انرژی مصرفی، زمان و میزان حلال مصرفی دارای مزیت ذاتی نسبت به روش مرجع کلونجر می‌باشد. Lucchesi و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند که برای گیاه اسطوخودوس، میزان انرژی مصرفی در روش استخراج به کمک مایکروویو (۰/۲۵ کیلووات–ساعت) بسیار پایین‌تر از مقدار انرژی مصرفی در روش تقطیر با کلونجر (۴/۵ کیلووات–ساعت) می‌باشد. همچنین زمان برای استخراج حداکثر میزان اسانس (۳۰ تا ۴۰ دقیقه) بسیار پایین‌تر از زمان لازم (۳۰۰ دقیقه) به روش کلونجر می‌باشد (Farhata et al., 2010; Mandal et al., 2007). تنها نقطه ضعف روش MAE تجزیه برخی از ترکیبات حساس به گرما می‌باشد (Liazid et al., 2007). Mandal و همکاران (۲۰۰۷)، Moret و همکاران (۲۰۱۹) و Bagade و Patil (۲۰۱۹) یک بررسی کامل از پارامترهای تاثیرگذار در روش MAE انجام دادند. بررسی آنها بیان‌گر آن بود که میزان توان مایکروویو، نوع حلال، نسبت ماده به حلال، زمان فرآیند، اندازه ذارت ماده، اختلاط، نحوه کنترل توان مایکروویو و دمای فرآوری از عوامل تاثیرگذار در این روش می‌باشند.

روش MAE برای استخراج اسانس بسیاری از گیاهان معطر و ادویه‌جات استفاده شده است. در پژوهشی برای استخراج اسانس آویشن باغی از قدرت مایکروویو ۹۹۰ وات در طول ۱۲۰ دقیقه در فشار یک اتمسفر، ۲/۵۲٪ اسانس (Golmakani and Rezaei, 2008) و برای مرزه مونتانا، ۰/۷٪ اسانس با توان مایکروویو ۶۶۰ وات در طول ۹۰ دقیقه در فشار اتمسفر به‌دست آمد (Rezvanpanah et al,. 2008). در پژوهش دیگری Dorneles و همکاران (۲۰۲۰) از روش MAE با توان‌های ۷۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ وات با زمان های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه برای استخراج ترکیبات فنلی کاج برزیلی (*Araucaria angustifolia*) استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد بهترین تیمار برای استخراج ترکیبات مورد نظر توان ۱۰۰۰ وات و زمان ۲۰ دقیقه می‌باشد.

استخراج عصاره جلبک قهوه‌ای سارگاسوم با استفاده از MAE نشان داد که فرایند استخراج با حلال آبی، زمان ۳۰ دقیقه و نسبت جلبک به حلال ۱ به ۲۰ تیمار بهینه برای استخراج عصاره از این جلبک می‌باشد (Babakhani Lashkan et al., 2012). Kooshesh و Golmakani (۲۰۱۵) بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست فعال از چغندر قرمز به کمک مایکروویو را انجام دادند. اثر سه متغیر توان، زمان و نسبت حلال متانول به نمونه بر بازدهی کلی استخراج، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد، میزان فنل و فلاوونوئید کل و بتالائین عصاره‌های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان دهنده آن بود که تیمار با نسبت ۱ به ۲۰ نمونه به حلال، زمان استخراج ۳۰ دقیقه و توان مایکروویو ۲۷۰ وات بهترین تیمار آزمایشی برای فرآیند استخراج می‌باشد (Kooshesh and Golmakani, 2015). Heleno و همکاران (۲۰۱۶) برای استخراج ارگوسترول از فرآورده‌های قارچ از روش MAE استفاده کردند و نتایجشان نشان داد که شرایط استخراج بهینه ۲/۹ ±۱۹/۴ دقیقه، ۱۲/۴ ±۱۳۲/۸ درجه سلسیوس و ۰/۵±۱/۶ گرم/ لیتر بود که در آن بازده ۲۶/۲ ±۵۵۶/۱ میلی‌گرم ارگوسترول در هر ۱۰۰ گرم قارچ حصول گردید. نتایج Arasi و همکاران (۲۰۱۶) برای بهینه‌سازی استخراج به کمک مایکروویو پلی-ساکارید از میوه گواوا (*Psidium guajava* L) به روش سطح پاسخ نشان داد که بازده بهینه استخراج ۶/۸۱٪ در سطح قدرت مایکروویو ۲۰۰ وات، نسبت آب به مواد گیاه ۱ به ۳ و ۲۰ دقیقه از زمان تابش حصول گردید. Belwal و همکاران (۲۰۲۰) برای بهینه‌سازی بازده استخراج و اثر متغیرهای توان مایکروویو، زمان فرآیند، نسبت ماده به حلال و pH حلال بر بازده استخراج از روش سطح پاسخ استفاده کردند. نتایج آنها بیان‌کننده قابلیت روش فوق برای کاهش تعداد آزمایش‌ها به کمک روش سطح پاسخ و مدل‌سازی با دقت مناسب برای بهینه‌سازی فرآیند بود.

در این پژوهش هدف ارزیابی کمیت و کیفیت اسانس‌گیری گیاه رزماری در سامانه توسعه داده استخراج اسانس به کمک مایکروویو و بهینه‌سازی فرایند می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) مورد استفاده در این تحقیق از اندام‌های هوایی گیاه رزماری کاشته شده در مزرعه دانشگاه کردستان جمع‌آوری و به‌صورت تازه و تر برای آزمایش‌ها استفاده شد. برای انجام هر آزمایش ۲۰۰ گرم از گیاه رزماری مورد آزمایش قرار گرفت. محتوای رطوبتی اولیه محصول بر اساس استاندارد AOAC (1980)، ۵۳٪ بر پایه‌تر بود.

### سامانه اسانس‌گیری

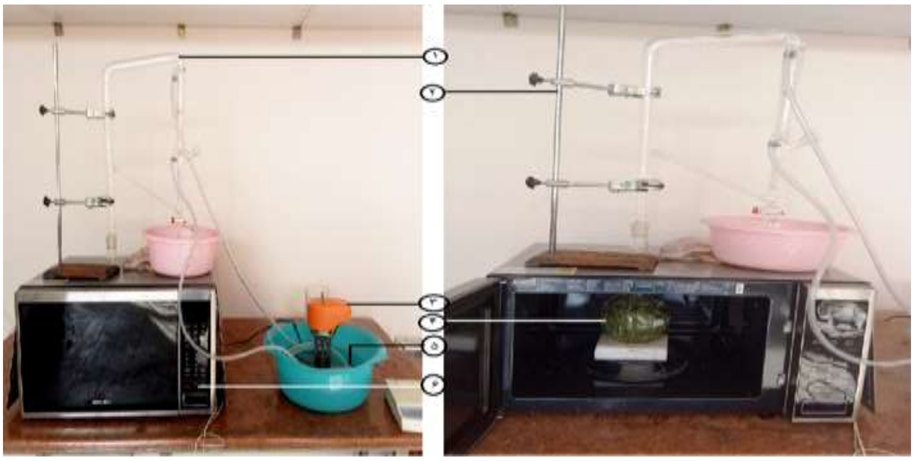
در این پژوهش یک سامانه اسانس‌گیری به کمک مایکروویو توسعه داده شد. این سامانه شامل قسمت‌های زیر بود: یک دستگاه مایکروویو خانگی، بالن، کندانسور تقطیر، منبع آب سرد و پمپ. برای ساخت و توسعه سامانه از یک دستگاه مایکروویو خانگی (Sumsong-ME3410W, Korea) با ابعاد محفظه ۳۴× ۲۴× ۳۴ سانتی‌متر و توان نامی ۹۰۰ وات و فرکانس ۲۴۵۰ هرتز برای تولید امواج مایکروویو با

اعمال تغییراتی در آن، استفاده شد (شکل ۱). محفظه مایکروویو از قسمت بالا سوراخ‌کاری شد و منفذی به قطر ۲ سانتی‌متر به اندازه دهانه لوله بالون ایجاد گردید. مواد خرده شده گیاهی در داخل یک بالن پیرکس به حجم ۱ لیتر قرار داده شد و دهانه خارجه شده بالن از مایکروویو به کندانسور سامانه وصل شد.

برای کندانس کردن بخارات آب و اسانس از آب و یخ با دمای صفر درجه سلسیوس استفاد شد که توسط یک پمپ (الکتروپمپ موتوژن تیپ SH205، ایران) از قسمت پایین وارد کندانسور شده و از بخش بالایی خارج می‌شود و به منبع آب سرد بر می‌گشت. برای اسانس‌گیری ۲۰۰ گرم از اندام هوایی گیاه خرد شد و با نسبت ۵:۲ آب مقطر به گیاه در داخل بالن اضافه می‌شد. سپس بالن حاوی ترکیب گیاه و آب در داخل مایکروویو قرار داده می‌شد. بعد از پایان فرآیند اسانس‌گیری، اسانس جمع شده بر روی آب قرائت و توسط یک سرنگ پزشکی جمع‌آوری می‌شد. سپس اسانس استخراجی توسط سولفات سدیم خشک آبگیری شد. بازده اسانس استخراجی از رابطه ۱ محاسبه می‌شد:

$$\text{بازده اسانس}\ (\%) = \frac{\text{حجم اسانس استخراجی}(\text{میلی‌لیتر})}{\text{جرم تر ماده}(\text{گرم})} * 100 \qquad (۱)$$

در نهایت اسانس حاصل در یک ظرف تیره ریخته شده و درپوش آن بسته شد و در دمای ۲ تا ۴ درجه سلسیوس تا زمان آنالیز توسط دستگاه‌های کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent 7990B, USA) در یخچال نگهداری شد (Omidbaigi, 2009). برای کنترل توان مایکروویو، مدار کنترلی دستگاه مایکروویو به‌طور کامل از مدار خارج کرده و از یک رله SSR (40 A- SSR relay, Tiwan)، برد آردینو (Arduino Mega-2560) و برنامه نوشته شده در محیط آردینو برای کنترل توان ورودی به مایکروویو استفاده شد. این برنامه با کنترل زمان روشن و خاموش بودن مایکروویو در یک سیکل کاری ۶۰ ثانیه، توان ورودی به مایکروویو را کنترل می‌کرد. تیمار شاهد در این پژوهش، استخراج اسانس از گیاه رزماری توسط دستگاه کلونجر با نسبت ۵:۲ (آب به گیاه) بود.




**شکل ۱- سامانه اسانس‌گیری: ۱- کندانسور، ۲- پایه و گیره، ۳- پمپ آب، ٤- بالن، ٥- آب و یخ، ٦- مایکروویو**

**Fig. 1. Essential oil system: 1. Condenser, 2. Base and clamp, 3. Water pump, 4. Balloon, 5. Ice and water bath, 6. Microwave.**

### روند انجام آزمایش‌ها

در این تحقیق از روش سطح پاسخ، در قالب طرح مرکب مرکزی با ۱۳ تیمار استفاده گردید. در این پژوهش تاثیر ۲ متغیر مستقل شامل توان در محدود ۳۰۰ تا ۹۰۰ وات و زمان در محدوده ۵ تا ۳۵ دقیقه بر بازده اسانس به‌عنوان متغیرهای وابسته بررسی گردید. بر اساس تحقیقات پیشین ۳۰ دقیقه برای توان‌های بالای ۱۰۰ وات، زمان کافی می‌باشد (Farhata et al., 2010; Mandal et al., 2007; Moradi et al., 2018). بر اساس پیش‌آزمایش‌ها، زمان ۳۵ دقیقه برای سطح توان ۳۰۰ وات برای استخراج حداکثر اسانس کافی بود، لذا زمان‌های بیشتر از ۳۵ دقیقه در نظر گرفته نشد. داده‌های ثبت شده در هر آزمایش شامل بازده اسانس در هر آزمایش بود. طراحی آزمایش‌ها توسط نرم‌افزار آماری Design Expert 10.0.3 انجام شد. در روش سطح پاسخ برای هر متغیر دامنه‌ای انتخاب می‌شود. به این ترتیب سطح سوم به‌عنوان سطح صفر یا مرکزی (۰)، مقداری بین کمینه و بیشینه است (جدول ۱). این پژوهش دارای دو متغیر مستقل در سه سطح و یک نقطه مرکزی که دارای پنج تکرار است، می‌باشد. در جدول ۲ متغیرها و سطوح کدبندی شده آن‌ها و میزان بازدهی اسانس استخراجی ذکر شده است. بعد از انجام آزمایش بر اساس تیمارهای پیشنهادی بازده اسانس استخراجی اندازه‌گیری در جدول ۲ یادداشت شد.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل و کدبندی با استفاده از روش سطح پاسخ

Table 1- Levels of independent variables and coded using RSM

| variable متغیر | symbol نماد | variable coded level سطوح کد بندی شده متغیر | | |
|---|---|---|---|---|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Power (w) توان (w) | A | 300 | 600 | 900 |
| Time (min) زمان (min) | B | 5 | 20 | 35 |

جدول ۲- اندازه‌گیری بازده اسانس

Table 2- Extraction Efficiency

| Treatment Number. شماره آزمایش | Power توان (W) | Time زمان (min) | Extraction efficiency بازده اسانس (٪) |
|---|---|---|---|
| **1** | 300 | 5 | 0 |
| **2** | 300 | 35 | 0.3 |
| **3** | 600 | 20 | 0.25 |
| **4** | 600 | 20 | 0.27 |
| **5** | 600 | 20 | 0.25 |
| **6** | 900 | 35 | 0.37 |
| **7** | 900 | 5 | 0.05 |
| **8** | 600 | 35 | 0.35 |
| **9** | 900 | 20 | 0.35 |
| **10** | 600 | 5 | 0.07 |
| **11** | 600 | 20 | 0.22 |
| **12** | 300 | 20 | 0.15 |
| **13** | 600 | 20 | 0.25 |

### ارزیابی کیفی اسانس

برای ارزیابی کیفی اسانس استخراجی و مقایسه آن با نمونه اسانس استخراجی توسط کلونجر نمونه‌های اسانس به بخش طیف‌سنجی آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم پایه دانشگاه کردستان جهت آنالیز GC-Mass ارسال شد.

### مدل‌سازی بازده اسانس به کمک RSM

پس از انتخاب طرح، معادله مدل تعیین شده و ضرایب آن پیش‌بینی می‌شوند. در این پژوهش از مدل خطی (رابطه ۲)، مدل خطی با برهم کنش خطی (رابطه ۳) و درجه دو (رابطه ۴) برای مدل‌سازی استفاده شد.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i \quad (۲)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum\sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (۳)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum \beta_{ii} x_i x_j + \epsilon \quad (۴)$$

در روش سطح پاسخ، عموماً معادله مدل درجه دوم کامل یا فرم کاهیده آن است. در رابطه ۳، $\beta_0$، $\beta_i$، $\beta_{ii}$ و $\beta_{ij}$ به‌ترتیب ضرایب ثابت، خطی، درجه دوم و اثر متقابل رگرسیون هستند. $X_i$ و $X_j$ متغیرهای مستقل کد شده هستند. $\varepsilon$ باقیمانده یا خطای مدل است. K شمارنده متغیرها است. i و j اندیس‌های متغیرهای مستقل می‌باشند و i کوچک‌تر از j است.

از ضریب تبین پیش‌بینی ($R^2_{Pre}$) برای تعیین قدرت پیش‌بینی مدل استفاده می‌شود. از نظر آماری مدلی مناسب است که دارای بالاترین مقدار $R^2$ و $R^2_{adj}$ تصحیح شده و $R^2_{Pre}$ باشد و هرچه مقادیر این ضرایب به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به‌عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد (Samavati, 2013). شرایط عملیاتی بهینه‌سازی کار اسانس‌گیری مایکروویو با استفاده از گزینه بهینه‌سازی عددی بررسی شد. بدین‌ترتیب که ابتدا اهداف بهینه‌سازی مشخص شده و در ادامه، محدوده‌های هر متغیر را براساس درجه‌ی اهمیت تعیین و نیز درجه وزنی برای هر متغیر اعمال گردید و در پایان بهترین جواب‌ها در بخش حل مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

## نتایج و بحث

### مدل‌سازی بازده اسانس استخراجی

سه مدل خطی، خطی با برهم کنش خطی و مدل درجه دو بر داده‌ها برازش داده شدند و نتایج برازش این مدل‌ها نشان داد که از بین این مدل‌ها، نرم‌افزار مدل درجه دو را پیشنهاد داده است (جدول ۳). این مدل پیشنهادی قادر است با مقادیر $R^2$، $R^2_{adj}$ و $R^2_{Pre}$ که به‌ترتیب عبارتند از ۰/۹۵۲۱، ۰/۹۱۸۰ و ۰/۵۵۷۴ مدل‌سازی را انجام دهد. این نتایج بر اساس شرکت تمام ترم‌های مدل در معادله نهایی حاصل شده است که دارای مقادیر $R^2$، $R^2_{adj}$ و $R^2_{Pre}$ گزارش شده در جدول ۳ می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی دارای قدرت پیش‌بینی پایین است و نیاز به اصلاح برای افزایش قدرت پیش‌بینی دارد.

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج جدول ۴ فقط ترم‌های زمان، توان و توان دوم زمان معنی‌دار هستند و ترم‌های اثر متقابل و توان دوم توان مایکروویو معنی‌دار نیستند. معادله‌ی پیشنهادی بر اساس شرکت تمام ترم‌ها به‌صورت رابطه ۴ حاصل شد. به دلیل فاصله زیاد بین $R^2_{adj}$ و $R^2_{Pre}$ معادله نیاز به اصلاح دارد. برای اصلاح معادله علاوه بر بررسی کفایت آماری مدل پیشنهادی و در صورت لزوم انتقال داده های بر اساس گزارشات کفایت آماری از روش گام به گام برای حذف پارامترهای غیرمعنی‌دار مدل هم استفاده شد تا ترم‌های غیرمعنی‌دار از معادله حذف شوند و نتایج برازش معادله بهبود یابند.

**جدول ۳- نتایج مدل‌های برازش داده شده**

**Table 3- Results of fitted models**

| | Std. dev | $R^2$ | $R^2_{adj}$ | $R^2_{Pre}$ | Model مدل |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0.048 | 0.8719 | 0.8463 | 0.7257 | Linear خطی |
| | 0.050 | 0.8719 | 0.8293 | 0.3815 | 2FI |
| Proposed پیشنهاد شده | 0.034 | 0.9521 | 0.9180 | 0.5574 | Quadratic درجه دوم |

**جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس اثر توان و زمان بر مقدار اسانس**

**Table 4- Results of ANOVA**

| P-value | F-value | Mean squares میانگین مربعات | Sum of squares مجموع مربعات | Degree of freedom درجه آزادی | |
|---|---|---|---|---|---|
| <0.0001 | 69.33** | 0.25 | 0.74 | 3 | مدل Model |
| 0.014 | *18.29 | 0.06 | 0.06 | 1 | Power -A |
| <0.0001 | 165.27** | 0.54 | 0.54 | 1 | Time -B |
| 0.98 | 0 | 0.000 | 0.000 | 1 | A*B |
| 0.45 | 0.64 n.s | 3.62e-3 | 3.62e-3 | 1 | $A^2$ |
| 0.043 | 24.42* | 0.088 | 0.088 | 1 | $B^2$ |
| | | 9.021e-4 | 3.906e-3 | 4 | خطا Error |
| | | | 0.79 | 12 | کل Total |

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، n.s غیرمعنی‌دار

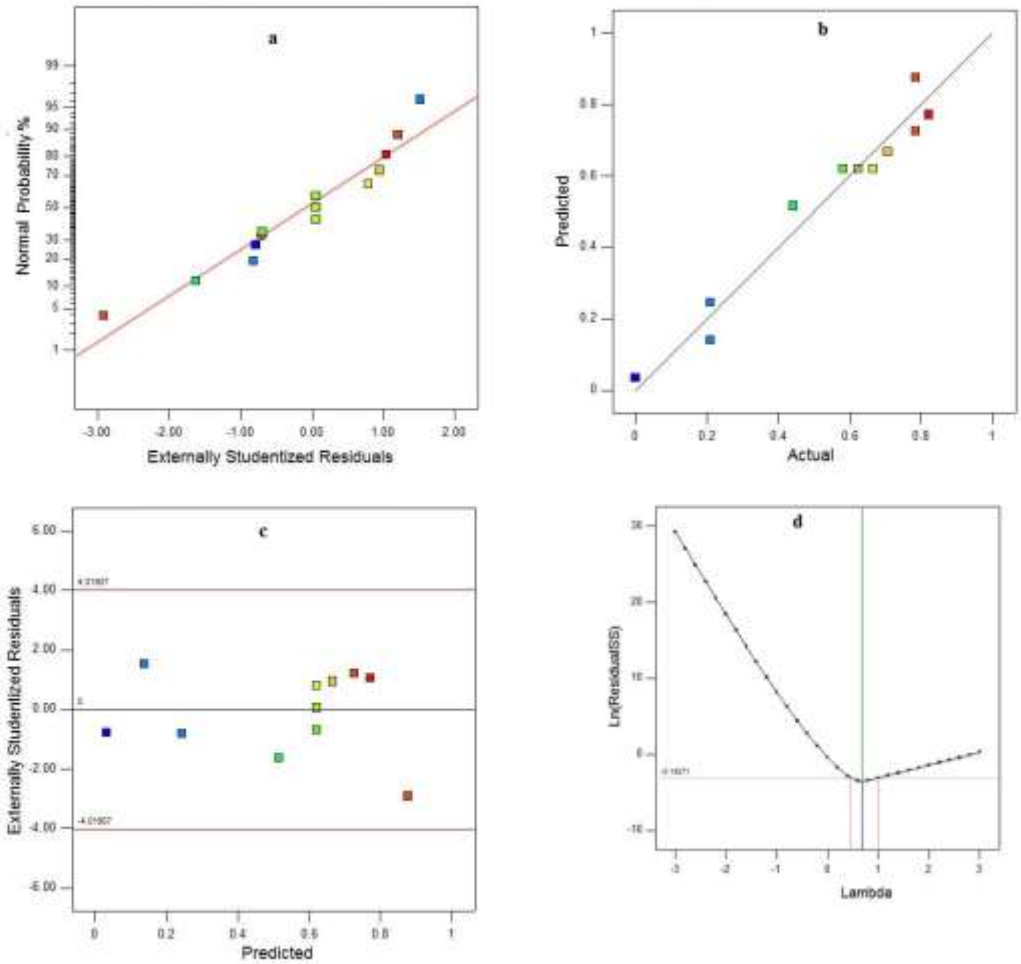
$$(R) = 0.51 + 0.1A + 0.31B + 0.000A * B - 0.036A^2 - 0.11B^2 \quad (۴)$$

$$(R) = -0.4433 + (8.16 * 10^{-4}Power) + (0.0403Time) - (2.4710^{-2}Power * Time) - (4.02310^{-7}Power^2) - (4.94 * 10^{-4}Time^2) \quad (۵)$$

در معادله ۴، R بازده اسانس (بر حسب درصد)، A توان مایکروویو (بر حسب وات) و B زمان (بر حسب دقیقه) می‌باشند.

نمودار احتمال نرمال (شکل ۲- الف) پراکندگی داده‌ها در فضای مدل را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل، می‌توان به خوبی پراکندگی خطی خطاهای مدل‌سازی را مشاهده کرد. این پراکندگی خطی به معنی توزیع نرمال خطاها در فضای ماتریس طراحی آزمایش‌ها است. در شکل (۲- ب) مقادیر حقیقی اندازه‌گیری شده بازده اسانس از آزمایشات در

مقابل مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل ۴ نشان داده شده است. نتایج بیان‌کننده آن است که این مدل می‌تواند بازده اسانس را در محدوده مشخص شده برای متغیرهای مستقل با ضریب همبستگی ۰/۷۴۶ تخمین بزند. قسمت پ شکل ۲ نمودار مقدار مانده‌ها در برابر مقادیر پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد که دارای پراکندگی تصادفی در سراسر نمودار است. این نمودار مقدار مانده‌ها را در مقابل مقادیر پیش‌بینی پاسخ نشان داده و فرض واریانس ثابت را آزمون می‌کند. این نمودار دارای پراکندگی تصادفی، که نشان‌دهنده طیف ثابت مانده، در سراسر نمودار می‌باشد و الگویی به شکل "<" در آن دیده نشد تا نیاز به استفاده از یک تابع انتقال توانی را نشان دهد




**شکل ۲- الف- نمودار توزیع نرمال خطاها، ب- مقادیر حقیقی بازده اسانس در مقابل مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل، پ- مقادیر پیش بینی شده در برابر مقادیر مانده‌های استیودنتیده داخلی، ت- نمودار باکس-کاکس برای تعیین درجه تابع مدل**

**Fig. 3. a) Normal probability plot of residuals, b) actual versus predicted extraction efficiency, c) Studentized residuals versus predicted values, d) Box-Cox plot for power transformations.**

در شکل (۲- ت) نمودار باکس- کاکس مدل پیشنهادی نشان داده شده است. این نمودار مناسب‌ترین ابزار برای تشخیص مناسب‌ترین تابع انتقال به منظور اعمال بر متغیر وابسته (مقدار اسانس) می‌باشد. در این نمودار پایین‌ترین، بهترین مقدار لاندا را که در آن حداقل مجموع مربعات مانده در مدل تبدیل شده ایجاد می‌شود را نشان می‌دهد. همچنین در این نمودار محدوده اطمینان ۹۵ درصد نشان داده شده است. بر اساس نتایج مدل بهترین مقدار پیشنهادی برای لاندا برابر ۰/۶۸ است. به عبارتی باید داده‌های مربوط به مقدار اسانس به‌وسیله تابع توانی به توان ۰/۶۸ انتقال داده شوند و مدل جدید بر داده‌ها برازش داده شود که در آن صورت مدل حاصله، حداقل مقدار خطا را خواهد داشت. لذا بر اساس نمودار باکس-کاکس و انتقال داده‌های پاسخ به فضای توانی، و همچنین استفاده از روش گام به گام برای حذف

ترم‌های غیرمعنی‌دار از مدل، مدل پیشنهادی به‌صورت ذیل به‌دست آمد:

$$R^{0.68} = 0.39 + 0.066A + 0.2B - 0.1B^2 \quad (۶)$$

$$R^{0.68} = -0.305 + (3.5 * 10^{-4}Power) + (0.0504Time) - (7.35 * 10^{-4}Time^2) \quad (۷)$$

نتایج مدل ارائه شده جدید در جدول ۵ گزارش شده است که نشان می‌دهد نسبت به مدل قبلی بخصوص $R^2_{Pre}$ از ۰/۵۵۷۴ به ۰/۸۸۶۴ رسید که نشان از بهبود عملکرد مدل جدید می‌باشد.

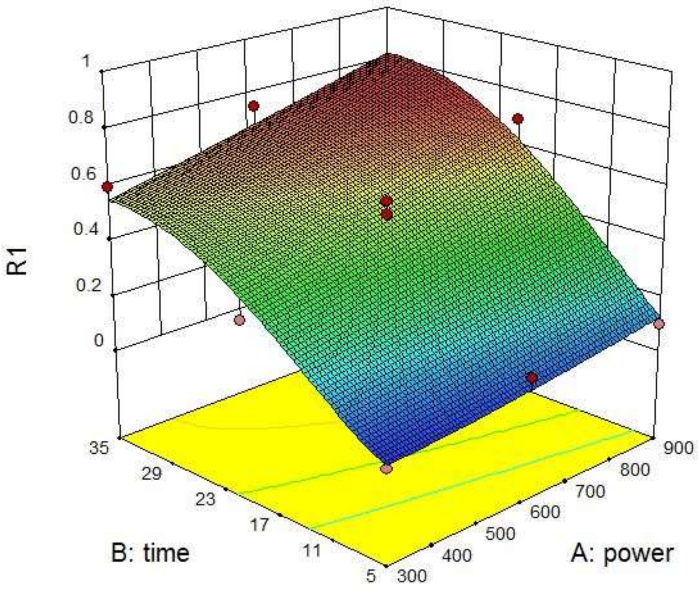
**جدول ۵- اطلاعات مربوط به مدل تجربی بازده اسانس استخراجی**

**Table 5- Experimental model results for extraction efficinacy**

| Value<br>مقدار | Parameter<br>پارامتر |
|---|---|
| 0.037 | **Std. Dev.** |
| 10.98 | **% CV** |
| 0.9590 | **$R^2$** |
| 0.9454 | **$R^2_{adj}$** |
| 0.8864 | **$R^2_{pred}$** |
| 0.018 | **خطای ریشه میانگین مربعات<br>Root mean square Error (RMSE)** |

**نمودار سطح پاسخ بازده اسانس استخراجی**

نمودار سطح پاسخ، یک تصویر گرافیکی سه‌بعدی می‌باشد که می‌تواند اثرات اختصاصی و تجمعی متغیرها و همچنین اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر متغیر وابسته را به تصویر بکشد. سطح پاسخ، خصوصیات هندسی سطح را نمایش می‌دهد و اهمیت ضرایب معادله به تصویر کشیده شده را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (Ravikumar et al., 2007). شکل ۳ نمودار سطح پاسخ توان و زمان بر بازده اسانس استخراجی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل قابل مشاهده است، با افزایش توان بازده اسانس استخراجی افزایش دارد. افزایش زمان نیز باعث افزایش چشم‌گیری در بازده اسانس استخراجی می‌شود. مطابق نتایج به‌دست آمده از جدول ۴ اثر متقابل توان و زمان بر بازده اسانس استخراجی معنی‌دار نبوده است. بی‌معنی بودن اثر متقابل دو عامل بر یکدیگر از نظر آماری نشان می‌دهد که هر عامل طوری بر روی خروجی اثر می‌گذارد که گویی عامل دیگر در آزمایش وجود ندارد.




**شکل ۳- نمودار سطح پاسخ درصد اسانس استخراجی**

**Fig. 3. Response surface of extracted essential oil efficiency**

## بهینه‌سازی فرآیند استخراج اسانس به کمک روش سطح پاسخ

بهینه‌سازی یکی از مهم‌ترین مراحل در طراحی و تحلیل آزمایش‌ها است. از آن‌جا که هدف تحقیق حاضر بهینه‌سازی استخراج اسانس می‌باشد، در این قسمت نتایج مربوط به مناسب‌ترین شرایط برای استخراج اسانس توضیح داده می‌شود تا بتواند نیازهای مورد نظر را تأمین کند. Myers و Montgomery (۱۹۹۵) تابع رضایت‌مندی یا مطلوبیت برای یافتن مناسب‌ترین تیمار آزمایشی پیشنهاد داده‌اند. تابع مذکور، محدوده رضایت برای هر پاسخ را مشخص می‌کند. مقدار رضایت‌مندی بین صفر و یک تغییر می‌کند. در بهینه‌سازی براساس تابع رضایت‌مندی، برای هر متغیر مستقل و هر پاسخ می‌توان هدفی تعیین کرد. اهدافی که در فهرست نرم‌افزار Design Expert وجود دارد شامل موارد: بیشینه، کمینه، عدد مورد نظر، محدوده مشخص و گزینه هیچ‌کدام می‌باشد. نرم‌افزار Design Expert گزینه دیگری هم تحت عنوان درجه اهمیت یا اهمیت وزنی دارد که مقادیر آن از ۱ تا ۵ متغیر است و می‌توان برای پاسخی که مهم‌تر است درجه اهمیت بالاتری لحاظ کرد. پس از تعیین اهداف برای هر متغیر مستقل و پاسخ، نرم‌افزار، ترکیب‌های پیشنهادی از سطوح متغیرها را همراه با تابع رضایت‌مندی هر ترکیب ارائه می‌کند.

در پژوهش حاضر با آن‌که هدف، افزایش میزان استخراج اسانس می‌باشد شروط بهینه‌سازی در جدول ۶ بیان شده است. پس از تعیین کردن هدف مطلوب، تیمارهایی که بتواند نتایج را به سمت اهداف نزدیک کند توسط روش سطح پاسخ و با استفاده از نرم‌افزار Design Expert پیشنهاد شد. در جدول ۷ نتایج بهینه‌سازی و مقادیر مطلوبیت برای هر ترکیب از مقادیر متغیرها مشخص شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از فرآیند بهینه‌سازی، برای رسیدن به هدف‌های مورد نظر می‌توان انتخاب‌های متنوعی داشت. نرم‌افزار تیمار با توان ۸۶۶ وات و زمان ۳۴ دقیقه برای شرایط کاری سامانه اسانس‌گیری پیشنهاد می‌دهد. بازده اسانس استخراجی به ازای مقادیر بهینه متغیرهای کاری پیشنهادی برابر با ۰/۳۸٪ می‌باشد.

**جدول ٦- شروط بهینه‌سازی**

**Table 6- Optimization conditions**

| Optimization condition<br>شروط بهینه‌سازی | Value<br>مقدار | Parameter<br>پارامتر |
|---|---|---|
| Within the specified range<br>در محدوده تعیین شده | 300- 900 | **Power**<br>**توان (w)** |
| Within the specified range<br>در محدوده تعیین شده | 5- 35 | **Time**<br>**زمان (min)** |
| Maximizing | 0.37 | **Extraction Efficiancy** |

| بازده اسانس (%) | بیشینه کردن |
|---|---|

جدول ۷- نتایج بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری با روش سطح پاسخ به همراه درصد مطلوبیت هر ترکیب

Table 7- Results of optimization of rosemary essential oil extraction by RSM with desirability of each treatments

| | Desirability مطلوبیت | Response پاسخ | Time زمان | Power توان | Number شماره |
|---|---|---|---|---|---|
| Elected انتخاب شده | 1 | 0.381 | 34.438 | 886.25 | **1** |
| | 1 | 0.380 | 34.250 | 862.50 | **2** |
| | 1 | 0.382 | 34.531 | 837.75 | **3** |
| | 1 | 0.375 | 33.969 | 818.438 | **4** |
| | 1 | 0.385 | 35.00 | 900.00 | **5** |
| | 1 | 0.377 | 34.695 | 810.938 | **6** |
| | 1 | 0.375 | 32.422 | 880.313 | **7** |
| | 1 | 0.371 | 33.875 | 772.50 | **8** |
| | 1 | 0.378 | 33.125 | 885.00 | **9** |
| | 1 | 0.371 | 31.367 | 898.106 | **10** |
| | 1 | 0.370 | 34.577 | 747.489 | **11** |

### ارزیابی کیفیت اسانس استخراجی

اسانس‌های به‌دست آمده از تنوع شیمیایی بالایی در میزان، نوع و تعداد ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه رزماری در توان ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ وات با زمان ۳۵ دقیقه و همچنین در دستگاه کلونجر برخوردار بود. مقدار عمده‌ترین ترکیبات اسانس رزماری در تیمارهای مختلف در جدول ۷ گزارش شده است. آلفا پینن، کامفن، بورنئول،کامفور، سینئول و کاریوفلین ترکیبات غالب اسانس بودند. در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ وات با زمان ۳۵ دقیقه مقادیر ترکیبات غالب اسانس مقداری بیشتر از کلونجر است. ولی در توان ۹۰۰ وات به دلیل بالا رفتن دما برخی از ترکیبات تخریب شده‌اند و درصد استخراج برخی ترکیبات بشدت کاهش داشته‌اند و در مقابل درصد استخراج کاریوفلن، وربنون و کاریوفلین اکسید به‌ترتیب به مقادیر ۲۳/۵۹۵، ۱۰/۹۴ و ۸/۴۱۸ رسیده است که نشان‌دهنده افزایش شدید مقادیر این ترکیبات در ۹۰۰ وات را دارد. کاریوفلین سنگین‌تر از مونوترپن‌هاست و بخاطر نقطه جوش بالا، در دماها و توان‌های بالا بهتر از بافت گیاه استخراج می‌شود. بدین خاطر در توان۹۰۰ وات درصد استخراج آن بیشتر از بقیه تیمارها است. همچنین بورنئول با ۱۳/۴۸۴ درصد نسبت به تیمار کلونجر، ۶۰۰ و ۳۰۰ وات دارای درصد بالاتری می‌باشد. هر چقدر توان مایکروویو بالا باشد، شدت انتقال انرژی افزایش می‌یابد و دما هم افزایش می‌یابد که منجر به تجزیه ترکیبات اسانس می‌شود. این نتایج با گزارش Mandal و همکاران (۲۰۰۷) و Bousbia و همکاران (۲۰۰۹) که کاربرد توان بالای مایکروویو منجر به تجزیه برخی از ترکیبات می‌شود، همخوانی دارد. همچنین کاهش شدید آلفا پنین از ۲۰/۲۰۸ درصد در توان ۳۰۰ وات به ۶/۰۳۳ درصد در توان ۹۰۰ با نتایج Moradi و همکاران (۲۰۱۸) که افزایش توان مایکروویو منجر به کاهش محسوس این ترکیب می‌شود، همخوانی دارد. از طرف دیگر ترکیبات کاریوفیلن اکسید فقط در تیمار ۹۰۰ مشاهده شده است. همچنین ترکیب دی-لیمونن فقط در تیمار ۳۰۰ و ۶۰۰ وات استخراج شد. از بین ترکیبات غالب اسانس آلفاپنین، کامفور و سینئول دارای بیشترین ارزش دارویی می‌باشند که با توجه به جدول ۸ بیشترین مقادیر برای این ترکیبات در تیمار ۳۰۰ وات استخراج شده است. در توان‌های بالاتر به خاطر تجزیه ترکیبات، مقدار استخراج این ترکیبات کاهش محسوسی داشته‌اند. همچنین در توان ۳۰۰ وات بازده استخراج این ترکیبات نسبت به کلونجر بیشتر است که نشان از ارزشمندی روش MAE در استخراج اسانس از گیاهان دارویی می باشد. عمده‌ترین ترکیبات موجود در روغن فرار رزماری بر اساس پژوهش‌های انجام گرفته در ایران (Ghannadi et al., 2002)، الجزایر (Djeddi et al., 2007)، هندوستان (Rahman et al., 2007) و فرانسه (Miladi et al., 2013) را سینئول، بورنئول، کامفن، آلفاپینن، کاریوفلین و کامفور تشکیل می‌دهند که بسته به شرایط جغرافیائی محل کشت گیاه، میزان هریک از این ترکیبات متغیر می‌باشد (جدول ۸). در این پژوهش‌ها از کلونجر برای استخراج اسانس استفاده شده است. ترکیبات غالب اسانس استخراجی در پژوهش حاضر نیز با ترکیبات غالب پژوهش‌های فوق الذکر دارای همخوانی می‌باشد.

جدول ۸- مقایسه ترکیبات غالب اسانس گیاه رزماری با مطالعات دیگر

Table 8- Comparison of dominant compounds of rosemary essential oil with other studies

| ترکیب | 300 W | 600 W | 900 W | Clevenger | Iran | Algeria | India | France |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| Compound | | | | کلونجر | ایران | الجزایر | هندوستان | فرانسه |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| آلفاپنین Alpha.-Pinene | 20.208 | 19.733 | 6.033 | 19.835 | 19.1 | 10.44 | 9.94 | 19.94 |
| کامفن Camphene | 5.439 | 5.756 | 1.846 | 5.726 | 8.90 | 7.20 | 6.90 | 5.339 |
| بورنئول Berbenol | 11.668 | 12.790 | 13.484 | 11.298 | 5.80 | 8.37 | 12.76 | 18.93 |
| کامفور Camphor | 12.198 | 11.619 | 3.037 | 10.883 | 15.90 | 9.31 | 26.44 | 19.87 |
| سینئول Cineole | 11.129 | 9.106 | 2.839 | 12.413 | 16.70 | 7.38 | 28.38 | 11.56 |
| Caryophyllene کاریوفیلن | 1.325 | 1.406 | 23.595 | 0.639 | 9.67 | 10.90 | 0.534 | 2.28 |
| .alpha.-Caryophyllene آلفا کاریوفیلن | – | – | 3.853 | – | – | – | – | – |
| Caryophyllene oxide کاریوفیلن اکسید | – | – | 8.418 | – | – | – | – | – |
| دی-لیمونن | 2.959 | 2.975 | – | – | – | – | – | 3.74 |
| بتا پنین beta.-pinene | 3.998 | 4.341 | – | 4.00 | 6.20 | – | – | – |
| وربنون Verbenone | 4.824 | 2.285 | 10.940 | 3.322 | – | – | – | – |

## نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که مقدار و کیفیت اسانس در روش مایکروویو با توان ۳۰۰ و ۶۰۰ وات نسبت به روش کلونجر در اکثر ترکیبات تفاوت چندانی نداشت. در بعضی ترکیبات کیفیت و مقدار اسانس استخراجی بیشتر بود. ترکیبات اسانس در توان ۹۰۰ وات تخریب می‌شود، بنابراین بهتر است که در آزمایشات حداکثر توان اعمال نگردد. البته اگر هدف استخراج بیشترین مقدار کاریوفیلن، وربنون و کاریوفیلن اکسید در اسانس استخراجی باشد، می‌توان از توان بالاتر استفاده کرد. تیماری که بیشترین مقدار اسانس و با ترکیبات اسانس استخراجی نزدیک به کلونجر در توان ۶۰۰ وات بود که در آن اکثر ترکیبات مهم رزماری استخراج شد. اگر از توان ۶۰۰ وات و زمان ۳۵ دقیقه استفاده شود با این شرایط کاری مقدار اسانس استخراجی به ۰/۳۵٪ می‌رسد که نسبت به شرایط پیشنهادی نرم‌افزار (۹۰۰وات با زمان ۳۴ دقیقه) حدود ۰/۳٪ اسانس کمتری استخراج می‌شود. زمان اسانس‌گیری با روش مایکروویو نسبت به اسانس‌گیری با کلونجر بسیار کمتر شد، در نتیجه در مصرف انرژی، صرفه‌جویی خواهد شد.

## منابع


Arasi, M. A. S. A. G., Rao, M. G. and Bagyalakshmi, J. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Psidium guajava* L. fruits. *International journal of biological macromolecules*, 91(1), 227- 232. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.039

AOAC. (1980). Official methods of analysis. 13th Edition, Association official analytical chemists, Washington DC.

Babakhani Lashkan, A., Rezaei, M, Rezaei, K., Seifabadi, S. J. (2012). Optimization of extraction of antioxidant compounds in microwave-assisted extracts of brown algae *Sargassum angustifolium*. *Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources*, 65(3), 243- 255. DOI: 10.22059/jfisheries.2012.29488

Belwal, T., Pandey, A., Bhatt, I. D., Rawal, R. S. Optimized microwave assisted extraction (MAE) of alkaloids and polyphenols from Berberis roots using multiple- component analysis. scientific reports, 10, 917. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57585-8.

Bagade, B. B., Patil, M. (2019). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A Review, critical reviews in analytical chemistry, DOI: 10.1080/10408347.2019.1686966.

Bousbia N, Vian M. A, Ferhat M. A, Petitcolas E, Melakati, B. Y, Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114(1):355- 362. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H. D. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 487-490.

Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. (2011). In vitro antibacterial activity and GC/ MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3): 89- 95.

Dorneles, M. S., Norena, C. P. Z. (2020). Extraction of bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* bracts by microwave- assisted extraction. *Journal of food processing and preservation*. 44(6), e14481. DOI:org.ezp.semantak.com/10.1111/jfpp.14481.

FAO. 2016. http://www.FAO.org.

Farhata, A., Fabiano- Tixierc, A. S., Visinoni, F., Romdhanea, M., Chemat. F. (2010). A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography*, 1217, 7345– 7350. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.062

Ghannadi, A., Sajadi, S. E., Ei-muslemi, M. A. M. (2002). Phytochemical investigations on flavonoids and constituents of volatile oil of rosmarinus officinalis. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 33:40.

Kooshesh, S., Golmakani, M. T. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*) and evaluating the antioxidant activity of obtained extract. *Electronic Journal of Food Processing and Preservation*, 7 (2): 39-60

Myers, R. H. Montgomery, D. C. (1995). Response surface methodology process and product optimization using designed experiments. *John Wiley and Sons*, New York, U. S. A, P. 714.

Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus*: Optimization by response surface methodology. *Journal of Carbohydrate Polymers*, 95: 588-597. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.041

Miladi, H., Slama, R., Mili, D., Zouari, S, Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography- mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6):729- 739. DOI:10.4236/ns.2013.56090

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction– an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 121- 135.

Moret, S., Conchione, Ch., Srbinovska, A., Lucci, P. (2019). Microwave-based technique for fast and reliable extraction of organic contaminants from food, with a special focus on hydrocarbon contaminants. Foods, 8, 503; DOI:10.3390/foods8100503.

Moradi, S., Fazlali, A., Hamedi, H. (2018). Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: comparison with traditional distillation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1): 22-28.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography *A*, 1140 (1- 2), pp. 29- 34. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040

Lucchesi, M. E., Chemat, F. Smalja, J. (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatogr. A*. 1043: 323-27.

Ravikumar, K., Krishnan, S., Ramalingam, S. Balu, K. (2007). Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent. *Dyes and Pigments*, 72(1): 66-74. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.07.018

Rahman, L., Kukerja, A., Singh, S., Singh, A., Yadav, A. Khanuja, S. (2007). Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttaranchal Hills, India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 16 (1):55– 57.

Omidbaigi, R. (2012). Production and processing of medicinal plants (Vol. 1). Astan Quds Publication, Tehran, 8th edition, pp. 348.

Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J., and Pérez-Álvarez, J. A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chimica Slovenica*, 54(4), 921.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to imain components. *Food Chemistry*, 108(3):1019– 1022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046